Aus dem Anatomischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. M. Arnold

Der Nachweis von intrazellulären Kalzium-Verschiebungen mit Chlorotetracyclin nach cholinerger Reizung embryonaler Zellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Martin Thomas Kaufenstein
aus Nürnberg

1985

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. M. Arnold

Der Nachweis von intrazellulären Kalzium-Verschiebungen mit Chlorotetracyclin nach cholinerger Reizung embryonaler Zellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Martin Thomas Kaufenstein
aus Nürnberg

1985

Dekan:	Professor Dr. med. M. Siess
1. Berichterstatter:	Professor Dr. med. U. Drews
2. Berichterstatter:	Professor Dr. med. H.-J. Ruoff

REFO-DRUCK HANS VOGLER TÜBINGEN

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1.	Das cholinerge System in embryonalen Zellen	1
1.2.	Die Darstellung von Kalzium in biologischen Systemen mit Chlorotetracyclin	2
1.3.	Der Nachweis von Kalzium-Bewegungen nach spezifischer Reizung	3
1.4.	Die eigene Versuchsanordnung	4
2.	Material und Methode	7
2.1.	Herstellung der Zellsuspensionen	7
2.1.1.	Ganze Embryonen	7
2.1.2.	Extremitätenknospe der Hühnerembryonen	8
2.1.3.	Glatte Muskelzellen aus dem Kolon des Meerschweinchens	8
2.2.	Färbevorgang	9
2.3.	Meßaufbau	10
2.4.	Reagentien	11
2.4.1.	Zur Herstellung der Zellsuspension	11
2.4.2.	Medikamente	12
3.	Ergebnisse	13
3.1.	Vorversuche zur Optimierung der Methode	13
3.1.1.	Küvette und Zelldichte	13
3.1.2.	Färbevorgang	14
3.1.3.	Spektren	17
3.1.4.	Vergleich der Meßkurven	20
3.2.	Messungen mit Zellsuspensionen ganzer Embryonen	23
3.2.1.	Reizung mit Acetylcholin mit und ohne Blocker	23
3.2.2.	Basiskurve ohne Ca und Mg	23
3.2.3.	Abstufung der Acetylcholinreaktion	24
3.2.4.	Reizung mit Parasympathomimetika	29
3.2.5.	Messungen mit dem Ca-Antagonist Verapamil	29
3.3.	Messungen mit Zellsuspensionen aus Extremitätenknospen	32

Seite

3.3.1. Reizung mit Acetylcholin mit und ohne Blocker 32
3.3.2. Reizung mit Parasympathomimetika 32
3.4. Messungen mit Zellsuspensionen aus glatten Muskelzellen des Meerschweinchendarms 35
3.4.1. Reizung mit Acetylcholin 35
3.4.2. Reizung mit Pilocarpin 35

4. Diskussion 40

5. Zusammenfassung 45

6. Literaturverzeichnis 47

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter der Leitung von Prof. Dr. U. Drews angefertigt. Besonders danken möchte ich ihm für die zahlreichen Diskussionen mit Kritik und Anregungen und für das immerwährende Interesse an der Fortführung meiner Arbeit.

Mein herzlicher Dank gilt auch Dr. A. Reich für die Einweisung sowie den Mitarbeitern des Anatomischen Instituts Tübingen, die meine Arbeit gefördert haben.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546522_0056

1. Einleitung

1.1. Das cholinerge System in embryonalen Zellen

In histochemischen Untersuchungen am Hühnerembryo fanden Drews et al. (1966), daß während der Embryonalentwicklung sowohl in einzelnen Zellen als auch in Organanlagen vorübergehend Cholinesterase-Aktivität nachweisbar ist. So ist in der Extremitätenknospe von ihrem ersten Erscheinen an eine Cholinesterase-Aktivität vorhanden, mit deren Auftreten und Verschwinden die einzelnen Entwicklungsschritte der Extremität dargestellt werden können (Drews und Drews 1972). Daneben kann die Bewegung embryonaler Zellen, teilweise zum Ort ihrer Differenzierung, mit Hilfe der Cholinesterase-Aktivität verfolgt werden. Diese enge Korrelation mit der Zellbewegung legt nahe, daß die Cholinesterase eine Funktion bei der Regulation der Morphogenese hat. Seinem zeitlichen Auftreten zufolge bezeichnete Drews (1975) in seiner Arbeit das Enzym als "embryonale Cholinesterase".

Zelluläre Cholinesterase-Aktivität weist gewöhnlich auf ein ganzes cholinerges System hin mit einem Acetylcholin-Rezeptor, einer Cholin-Acetyltransferase und Acetylcholin selbst als Komponenten. Die Cholinesterase, die bei morphogenetischen Prozessen auftritt, wurde im Seeigel von Ozaki (1976) und in der Hühnchen-Extremitätenknospe von Schröder (1980) biochemisch charakterisiert. Acetylcholin wurde von Fluck (1978) im Fischembryo nachgewiesen.

Eine Identifizierung des Acetylcholin-Rezeptors an cholinesteraseaktiven Embryonalzellen der Hühnchenextremität durch Schmidt (1981) ergab, daß es sich um einen Rezeptor muskarinischer Natur handelt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, eine biologische Reaktion der embryonalen Zelle auf eine Reizung des muskarinischen Rezeptors nachzuweisen. Da Kalzium intrazellulärer Regulator vieler Vorgänge z.B. auch bei der Kontraktion am Muskelgewebe ist, soll hier untersucht werden, ob sich eine Kalzium-Verschiebung in der Zelle auf Reizung des muskarinischen embryonalen Rezeptors hin ergibt.

1.2. Die Darstellung von Kalzium in biologischen Systemen mit Chlorotetracyclin

Die intrazelluläre Verschiebung von Kalzium (Ca) läßt sich mit Chlorotetracyclin (CTC) fluorometrisch darstellen (Caswell 1972). Dabei bildet CTC mit Ca einen fluoreszierenden Komplex. Gegenüber Messungen mit radioaktivem ^{45}Ca hat diese Methode den Vorteil, daß eine kontinuierliche Beobachtung des Ca während dessen Verschiebung in der Zelle durch eine Reizung ermöglicht wird.

Die Fluoreszenz des Ca-CTC-Komplexes ist in Methanol wesentlich stärker als in wässrigem Medium. Der Ca-CTC-Komplex bindet sich bevorzugt an Kationen auf Membranoberflächen (Caswell 1972).

Die Differenzierung zwischen Ca-CTC-Komplex und Mg-CTC-Komplex wird ermöglicht durch unterschiedliche Fluoreszenzspektren: So liegt im Excitationsspektrum das Maximum des Ca-Komplexes bei 390 nm, das des Mg-Komplexes bei 375 nm (Caswell 1972); im Emissionsspektrum liegt das Maximum für Ca bei 530 nm, das für Mg bei 520 nm (Caswell & Hutchison 1971b). Dieser Unterschied der Spektren wurde in Methanol beobachtet. Er ist in wässriger Phase nicht vorhanden. In einer Membran-Fraktion ist die Intensität der Fluoreszenz des Ca-CTC-Komplexes um ca. 65% höher als die des Mg-CTC-Komplexes (Hallett et al. 1972). Die Affinität von CTC ist für Ca auf Membranoberflächen drei Mal höher als für Mg (Caswell 1979).

Eine Abhängigkeit der Fluoreszenz des Komplexes vom pH im Bereich zwischen 6,0 und 8,5 besteht nicht. Die Affinität der Kationen zum CTC wird jedoch vom pH beeinflußt, so daß auf eine gute Pufferung der Proben geachtet werden muß (Caswell 1972).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Fluoreszenz des CTC den Gehalt an membrangebundenem (hauptsächlich intramitochondrialem) Ca anzeigt (Luthra & Olson 1976).

Mit Hilfe des CTC hatte A.H. Caswell (1972) die Bewegung von zweiwertigen Kationen, vor allem Ca, in Mitochondrien der Rattenleber nachgewiesen: Der Fluoreszenzfarbstoff CTC zeigt eine hohe Fluoreszenz in Anwesenheit von Mitochondrien,

die darauf zurückzuführen ist, daß das CTC mit dem membrangebundenen Ca und Mg einen Komplex bildet. Die Intensität der Fluoreszenz des Kation-CTC-Komplexes ist abhängig von der Polarität der Umgebung (Caswell & Hutchison 1971a).

Während Caswell et al. (1971) ihre Messungen nur an Mitochondrien durchführten, benutzten Babcock et al. (1979) neben Zellorganellen auch intakte Hepatozyten der Ratte für ihre Arbeit: Sie verglichen die Fluoreszenz-Intensitäten einer Mitochondrienfraktion mit der einer Mikrosomenfraktion und der einer Zellsuspension. Es zeigte sich die weitaus größte Intensität bei den isolierten Mitochondrien, während die Mikrosomenfraktion kaum eine Fluoreszenz aufwies. Die Zellsuspension stellte bei diesem Vergleich einen Mittelwert zwischen beiden Extremwerten dar. Dies entspricht den bereits früher gemachten Beobachtungen (Du Buy & Showacre 1961, Allison & Young 1964, Chandler & Williams 1978), daß die CTC-Fluoreszenz und damit die größte Menge des intrazellulären Ca in den Mitochondrien lokalisiert ist. Weiter zeigt die Arbeit von Babcock et al. (1979), daß die Inkubation der Zellen mit einem Entkoppler der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung zu einer starken Verminderung der Fluoreszenz führt.

1.3. Der Nachweis von Kalzium-Bewegungen nach spezifischer Reizung der Zellen

Um eine Freisetzung von Ca bei Hepatozyten zu erreichen, angezeigt durch eine Fluoreszenzintensitätsabnahme, wurden die Zellen bei den Versuchen von Babcock et al. (1979) mit Noradrenalin gereizt. Katecholamine induzieren über einen adrenergen Rezeptor an der Leberzelle die Glukoneogenese (Blackmore et al. 1978) und setzen dabei intrazelluläres Ca frei (Chen, Babcock and Lardy 1978). Außerdem wurde die Reaktion der Zellen auf Zugabe von Ionophor A 23187, das den Ca-Durchstrom durch Membranen frei ermöglicht, untersucht. Dabei ergab sich eine Intensitätsabnahme der Fluoreszenz bei Zugabe sowohl von Noradrenalin als auch von A 23187, wobei der Abfall auf das Ionophor wesentlich deut-

licher als auf das Noradrenalin war. Die Reaktionen ließen sich bei der gleichen Zellsuspension hintereinander auslösen, wobei es keine Rolle spielte, ob zuerst A 23187 und dann Noradrenalin zugegeben wurde, oder umgekehrt. Dabei erstreckte sich der Zeitraum einer Messung über ca. 15 Minuten.

Mikkelsen & Schmidt-Ullrich (1980) haben an intakten Kaninchen-Thymozyten durch Stimulierung mit Concanavalin A, das bei Lymphozyten die Blastentransformation induziert, eine Ca-Verschiebung nachgewiesen. Sie stellten eine Zellsuspension mit ca. 10^7 Zellen/ml her und inkubierten mit CTC. Durch Zugabe von Concanavalin A ergab sich eine Abnahme der Fluoreszenz. Dabei stellte sich die Steigung der Intensitätskurve nach ca. 5 Minuten wieder auf den Wert der Kontrollkurve einer ungereizten Zellsuspension ein, nur auf einem niedrigeren Intensitätsniveau. Der Umfang des Intensitätsabfalls korrelierte mit der Konzentration des Concanavalin A. Concanavalin A hat bei den verwendeten Konzentrationen keinen Einfluß auf den Einstrom extrazellulären Ca's in die intakten Zellen oder auf Ca-Bewegungen an isolierten Membranvesikeln. Dies wiesen die Autoren durch Messungen mit ^{45}Ca nach. Jedoch erfolgte ein Ausstrom von ^{45}Ca aus den intakten Thymozyten nach Concanavalin A parallel zur Abnahme der CTC-Fluoreszenz nach Concanavalin A. Sowohl die Fluoreszenzabnahme als auch die ^{45}Ca-Freisetzung nach Concanavalin A war durch Antimycin vollständig hemmbar. Eine Fluoreszenzabnahme bei isolierten Mitochondrien aus Thymozyten nach Stimulierung mit Concanavalin A trat nicht auf. Concanavalin A führt also über einen Rezeptor auf der Zellmembran oder über eine direkte Interaktion nach der Lectin-Phagozytose zu einer intrazellulären Ca-Freisetzung.

1.4. Die eigene Versuchsanordnung

Um einen möglichst hohen Anteil an embryonalen Zellen mit muskarinischem Rezeptor, die jedoch keine Muskel- oder Nervenzellen sind, zu erreichen, wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst zur Herstellung der Zellsuspension die

Extremitätenknospe von Hühnerembryonen benutzt. Die Embryonen befanden sich im Stadium 23/24 nach Hamburger & Hamilton (1951). In diesem Stadium, so fanden Drews und Drews (1972) in ihrer Arbeit, ist eine Cholinesterase-Aktivität im Knorpelblastem der Extremitätenknospe vorhanden. Zu diesem Zeitpunkt sind weder Neuroblasten noch Myoblasten in der Extremitätenknospe differenziert. Eine Reaktion der Zellen aus der Extremitätenknospe auf Acetylcholin ist daher auf die Cholinesterase-aktiven Chondroblasten zurückzuführen, zumal auch Schmidt (1981) einen muskarinischen embryonalen Rezeptor auf diesen Zellen feststellte.

Um eine sichtbare Änderung der Fluoreszenzintensität zu erreichen, war eine große Zelldichte (10^7 Zellen/ml) notwendig, wie sie auch Mikkelsen & Schmidt-Ullrich (1980) verwendeten.

Aus diesem Grund stellte ich zur Ausarbeitung und Optimierung der Methode zunächst die Suspension aus den kompletten Embryonen her, zumal im Stadium 24 eine große Zahl anderer Organanlagen ebenfalls eine hohe embryonale Cholinesterase-Aktivität aufweist (Drews 1975). Dabei wurden für vier Messungen 10-15 Embryonen verarbeitet, um eine Zelldichte von 10^7 Zellen/ml zu erhalten. In diesen Versuchen erhielt ich auf eine Zugabe von Acetylcholin eine Fluoreszenzabnahme, die sich durch Atropin hemmen ließ. Die Hemmung durch Atropin zeigte, daß es sich um eine Reizung am muskarinischen embryonalen Rezeptor handelt.

Nachdem die Methode standardisiert war und reproduzierbare Ergebnisse vorlagen, führte ich die gleichen Versuche mit einer Zellsuspension aus 184 Extremitätenknospen von 46 Embryonen durch und erhielt gleiche Ergebnisse wie bei den Messungen mit Suspensionen aus ganzen Embryonen.

Als Kontrolle des Systems und der Methode führte ich Messungen an einer Zellsuspension aus glatten Muskelzellen vom Kolon des Meerschweinchens durch. Diese Zellen reagieren auf Reizung ihres muskarinischen Rezeptors mit einer Änderung des Membranpotentials und einer intrazellulären Ca-Erhöhung durch Freisetzung von Ca (Keidel 1979). Bei glatten Muskelzellen stammt das Ca nur zu einem geringen

Teil aus dem kaum vorhandenen sarkoplasmatischen Retikulum und zum größten Teil vom Membran- bzw. Oberflächen-Ca. Das Ca induziert die mechanische Reaktion der kontraktilen Elemente. Wie zu erwarten nahm die Fluoreszenz bei Acetylcholinzugabe ab. Mit Pilocarpin erhielt ich einen weitaus größeren Intensitätsabfall als mit Acetylcholin, der durch mehrmalige Zugabe von Pilocarpin wiederholt werden konnte.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß ich einen Fluoreszenzabfall auf Reizung durch Acetylcholin an Zellsuspensionen ganzer Hühnerembryonen nachweisen konnte, der sich durch Atropin hemmen ließ. Gleiche Ergebnisse erhielt ich darauf bei Messungen an Suspensionen nur aus Extremitätenknospen des Hühnchens, in denen noch keine Nerven- und Muskelzellen differenziert sind.

2. Material und Methode

2.1. Herstellung der Zellsuspensionen

2.1.1. Ganze Embryonen

Es wurden befruchtete Hühnereier (Hybriden, Stamm: weißes Leghorn) von der Geflügelproduktionsgesellschaft "Süd", Schloßgut Laupheim mbH & Co KG bezogen und für 3 1/2 Tage bei 37° C bebrütet. Die Eier wurden geöffnet und die Embryonen, die sich jetzt im Stadium 23/24 nach Hamburger & Hamilton (1951) befanden, entnommen; für einen Präparationsgang waren 10-15 Embryonen notwendig.

Nach Entfernen der Eihäute wurden die Embryonen mit einem Federscherchen in Hankslösung zerkleinert. Nach zweimaligem Spülen der Gewebestückchen in Ca,Mg-freier Hankslösung wurden sie für 30 Minuten im Kühlschrank bei 4° C in 5 ml Trypsin-Pankreatinlösung (pH 7,1; steril filtriert) in einem silikonisierten Erlenmeyerkolben inkubiert. Für weitere 30 Minuten bei 4° C mit einem Magnetrührer bei höchster Drehzahl disaggregiert und nachdisaggregiert mit doppelt ausgezogener Glaskapillare.

Für 15 Minuten wurde die Suspension in 20 ml Trypsininhibitorlösung bei 37° C inkubiert, danach filtriert durch ein Nylonnetz mit der Maschenweite von 30 µm, auf 4 Plastikzentrifugenröhrchen verteilt und bei 400-500 Umdrehungen pro Minute für 15 Minuten zentrifugiert (Volumen der Suspension: ca. 4 x 6,25 ml = 25 ml).

Nach Abziehen des Überstandes mit der Wasserstrahlpumpe wurde das Sediment aufgenommen und mit etwa 2-3 ml voller Hankslösung verdünnt, um die sich jetzt anschließende Zellzählung in der Zählkammer nach Neubauer zu erleichtern. Je nach Zelldichte wurde mit voller Hankslösung weiterverdünnt, bis eine Zelldichte von ca. 10^7 Zellen/ml erreicht war (Beispiel: Zellzählung: ca. 2 X 10^7 Zellen/ml bei 4 ml Volumen nach der ersten Verdünnung. Deshalb Verdünnung auf 8 ml, woraus sich eine Zelldichte von ca. 10^7 Zellen/ml ergab).

Die Suspension wurde jetzt zu je 1,8 ml in Eppendorfhütchen (2,2 ml Volumen) verteilt und bei 37° C in einem Inku-

bator mit einem Gerät zur Durchführung von Rollerkulturen gerollt. Die Zellsuspension befand sich so in einer "Wartestellung" vor der Messung. Die Zugabe von 0,2 ml 0,2 mM-CTC-Lösung in das entsprechende Eppendorfhütchen erfolgte 10 Minuten vor Beginn der Messung. Auch während dieser Färbung wurde die Suspension bei 37° C im Inkubator gerollt.

2.1.2. Extremitätenknospe der Hühnerembryonen

Nach Entnahme der Embryonen aus den Eiern und Entfernen der Eihäute wurden alle Extremitätenknospen der Embryonen unter dem Stereomikroskop abgeschnitten. Die weitere Behandlung war mit der der ganzen Embryonen identisch. Die Anzahl der Embryonen betrug 46 im Stadium 24/25 (Hamburger & Hamilton 1951). Die davon gewonnenen 184 Extremitätenknospen ergaben 8,5 ml Zellsuspension mit einer Zelldichte von ca. 10^7 Zellen/ml. Das Volumen wurde für 5 Messungen à 1,7 ml Suspension verteilt.

2.1.3. Glatte Muskelzellen aus dem Kolon des Meerschweinchens

Zwei Meerschweinchen wurden durch Äthernarkose getötet. Nach Entfernen der Haare am Bauch und Eröffnen der Bauchdecken wurden unter dem Stereomikroskop die Taeniae coli abpräpariert und mehrmals in voller Hankslösung gespült. Die zerschnittenen Taenien je eines Tieres wurden in je einem silikonisierten 25 ml-Erlenmeyerkolben mit 10 ml Kollagenaselösung versetzt und bei 37° C für 60 Minuten inkubiert. Danach wurden von jedem Kolben 5 ml Kollagenaselösung abgezogen und gesammelt, das Material im Kolben mit einer doppelt ausgezogenen Glaskapillare disaggregiert und für weitere 30 Minuten bei 37° C inkubiert.

Nach erneutem Disaggregieren wurden zu jedem Kolben 20 ml Trypsininhibitorlösung aus Sojabohne zugegeben und für 15 Minuten inkubiert. Die Zellsuspension aus beiden Kolben wurde nun durch ein Nylonnetz mit einer Maschenweite von 30 µm filtriert, in Plastikzentrifugenröhrchen verteilt und bei 400-500 Umdrehungen pro Minute für 15 Minu-

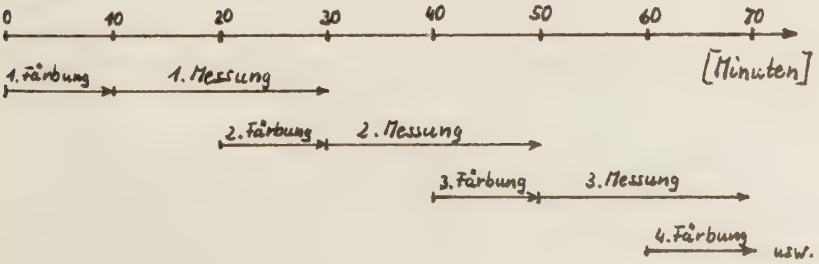
ten zentrifugiert.

Das Sediment konnte für die erste Messung benutzt werden. Die Zelldichte lag bei 0,75 x 10^7 Zellen/ml bei einem Volumen von 1,7 ml.

Der an den Zentrifugenröhrchen haftende Bodensatz aller Röhrchen wurde erneut mit den 10 ml abgezogener Kollagenaselösung versetzt, für 30 Minuten inkubiert, disaggregiert und für 15 Minuten in 10 ml zugefügter Trypsininhibitorlösung belassen. Wieder schloß sich Filtration und Zentrifugation in Plastikröhrchen an. Alle abgezogenen Überstände sammelte ich, um nochmals bei 1000 Umdrehungen pro Minute zu zentrifugieren und damit möglichst alle Zellen zu gewinnen. Für die zweite Messung ergab sich daraus eine Zelldichte von 0,7 x 10^7 Zellen/ml. Die CTC-Zugabe geschah wie bei den Zellsuspensionen aus Hühnerembryonen.

2.2. Färbevorgang

Da die Anfärbung des Ca in den Zellen durch CTC nach dessen Zugabe einige Minuten benötigte, wurde die Messung erst 10 Minuten nach der Zugabe begonnen. In dieser Zeit befanden sich die Zellsuspensionen bei 37° C in Dunkelheit und wurden in einem Gerät zur Durchführung von Rollerkulturen gerollt, um so ein Absetzen der Zellen zu verhindern. Da eine Messung etwa 20 Minuten in Anspruch nahm, ergab sich folgender Färbe-Zeit-Plan, für 4 Zellsuspension-Portionen aus einer Zellpräparation, wobei der Zeitpunkt 0 Minuten in der Abbildung die erste CTC-Zugabe in eine der vier Portionen darstellt:



Dadurch konnten die Messungen in unmittelbarer Reihenfolge durchgeführt und so die Wartezeit der Zellsuspensionen möglichst kurz gehalten werden.

2.3. Meßaufbau

Gemessen wurde in einem Spektrofluorometer der Firma I.S.A. Jobin-Yvon, Longjumeau - Frankreich, Typ JY 3 D. Daran angeschlossen war ein Computer der Firma Hewlett-Packard, San Diego - California USA, Typ 9815 A, der aufgrund einer magnetisch aufgezeichneten Software von Jobin-Yvon die Intensitätswerte vom Fluorometer abnahm und damit einen Plotter der Firma Hewlett-Packard, Typ 7225 B steuerte.

Die benutzten Programme schrieben entweder die Intensität in Abhängigkeit der Wellenlänge des Erreger- oder Fluoreszenzlichtes, oder in Abhängigkeit der Zeit mit beliebigem Start- und Endzeitpunkt. Dem Computer einzugeben war jeweils der Einheitenbereich der Intensität und der Bereich der Wellenlänge bzw. die Dauer der Kurvenaufzeichnung mit dem Zeitabstand, in dem die Meßwerte aufgezeichnet werden sollten. Zur Steuerung der Excitations- bzw. Emissionswellenlänge am Fluorometer bei der Aufzeichnung von Spektren diente ein Scanner, dessen Geschwindigkeit auf 50 nm/min eingestellt war.

Die Einstellungen am Fluorometer ließ ich nach Herausfinden der für die Darstellung der Kurven optimalen Werte konstant für alle Messungen, die in der Arbeit mit Abbildungen dargestellt sind, um einen direkten Vergleich untereinander zu ermöglichen: Schlitzblenden: 10 nm, 10 nm, 10 nm, 10 nm; Energie: 5; Integration: 1; Concentration: 10 bei der Grobeinstellung und 1 3/4 Umdrehungen der stufenlosen Feineinstellung vom Linksanschlag weg nach rechts; Excitation: 389 nm; Emission: 529 nm.

Die Zellsuspension befand sich zur Messung in einer 4 ml-Quarz-Küvette und wurde durch einen Magnetrührer (Stellung 1) in Bewegung gehalten. Außerdem durchfloß Wasser von 37^{o} C den Küvettenhalter, das durch einen

Temperaturregler mit Pumpe auf konstanter Temperatur gehalten wurde.

Vor Beginn der Messung erfolgte noch die Zugabe von 20 µl 10^{-2} M Eserin. Das Einbringen der 20 µl Medikamentenlösung in die Küvette während der Messung geschah mit Hilfe eines auf entsprechende Länge abgeschnittenen Venenkatheters, der auf eine 20 µl-Eppendorf-Pipette aufgesteckt war und über ein S-förmig gebogenes Glas-Führungsrohr in die Küvette getaucht werden konnte, ohne daß Lichteinfall die Messung beeinflußte.

2.4. Reagentien

2.4.1. Zur Herstellung der Zellsuspension

- Volle Hankslösung (ohne Phenolrot), Paul 1975

NaCl	8,00	g/l	137,0	mmol/l
KCl	0,40	g/l	5,4	mmol/l
$CaCl_2$	0,14	g/l	1,3	mmol/l
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	0,10	g/l	0,4	mmol/l
$MgCl_2 \times 6\ H_2O$	0,10	g/l	0,5	mmol/l
$Na_2HPO_4 \times 2\ H_2O$	0,06	g/l	0,3	mmol/l
KH_2PO_4	0,06	g/l	0,4	mmol/l
Glucose	1,00	g/l	5,5	mmol/l
$NaHCO_3$	0,35	g/l	4,2	mmol/l

- Ca,Mg-freie Hankslösung: wie volle Hankslösung, jedoch ohne $CaCl_2$, $MgSO_4 \times 7\ H_2O$, $MgCl_2 \times 6\ H_2O$.
- Dulbecco's PBS (Paul 1975)

NaCl	8,00	g/l	137,0	mmol/l
KCl	0,20	g/l	2,7	mmol/l
$CaCl_2$	0,10	g/l	0,9	mmol/l
$MgCl_2 \times 6\ H_2O$	0,20	g/l	1,0	mmol/l
$Na_2HPO_4 \times 2\ H_2O$	1,15	g/l	6,5	mmol/l
KH_2PO_4	0,20	g/l	1,5	mmol/l
Glucose	0,90	g/l	5,0	mmol/l

- Kollagenase aus Clostridium histolyticum von der Firma Boehringer Mannheim GmbH, 0,3%ig angesetzt in voller Hankslösung; pH 7,2.

- Trypsin-Pankreatinlösung: Trypsin 1:250 und Pankreatin von der Firma DIFCO-Laboratories Detroit, Michigan USA, angesetzt 2,25% Trypsin, 0,75% Pankreatin in Ca,Mg-freier Hankslösung, 30 Minuten bei 37° C inkubiert, steril filtriert durch Milliporefilter, aufgefangen in sterilen Gefäßen und titriert auf pH 7,1.
- Trypsininhibitorlösung: Trypsininhibitor aus Sojabohne ca. 20 IE/mg, Firma Serva, Heidelberg, 20%ig angesetzt in voller Hankslösung, pH 7,1.
- Chlorotetracyclin-Hydrochlorid No. C-4881 von der Firma Sigma, St. Louis USA, angesetzt in voller Hankslösung, pH 7,1.

2.4.2. Medikamente

- Acetylcholinchlorid: 150 mg Portion No. 420-150 von der Firma Sigma St. Louis USA, verdünnt auf 10^{-2} M.
- Eserin-Sulfat No. E-8625 der Firma Sigma, St. Louis USA
- Atropinium-Sulfat Art. 1575 der Firma Merck, Darmstadt
- d-Tubocurarin Nr. 90353, Firma Asta Werke AG, Brackwede
- Decamethoniumbromid No. D-1260, Firma Sigma, St. Louis USA
- Carbamyl-ß-Methyl-Cholin-Chloride (Betanechol) No. C-5259, Firma Sigma, St. Louis USA
- Pilocarpiniumchloride, Firma Serva, Heidelberg
- Tremorin, Firma Serva, Heidelberg

Alle Medikamente angesetzt in voller Hankslösung zu einer Stammlösung mit 10^{-2} M.

- Verapamil-Hydrochlorid, Firma Knoll AG, Ludwigshafen, angesetzt in voller Hankslösung 10^{-4} M, aufgelöst durch ansäuern bis pH 6,0, dann titriert mit NaOH bis pH 7,2.

3. Ergebnisse

3.1. Vorversuche zur Optimierung der Methode

3.1.1. Küvette und Zelldichte

Die ersten Messungen fanden in einer 4 ml Küvette statt, die, um den Lichtspalt komplett in die Suspension tauchen zu lassen, mit mindestens 1,9 ml gefüllt werden mußte. Um eine hohe Zelldichte von ca. 10^7 Zellen/ml zu erreichen, mußten deshalb sehr große Mengen von Zellmaterial hergestellt werden: absolut etwa 2 x 10^7 Zellen pro Messung! Die Gewinnung einer so großen Zellmenge aus den Extremitätenknospen des Hühnchens erforderte einen großen Arbeitsaufwand. Daher habe ich zunächst versucht, die Messung in einer Durchflußküvette mit einem Probenvolumen von 200 µl durchzuführen. Dabei ergaben sich jedoch mehrere Probleme: Da in der Mikroküvette nicht mit einem Magnetrührer gerührt werden konnte, setzten Sedimentationsvorgänge der Zellen ein, die zu einem starken Abfall der Fluoreszenzintensität führten. Aber auch CTC-Lösungen ohne Zellen zeigten einen stärkeren Kurvenabfall als in der 4 ml Küvette. Das läßt sich dadurch erklären, daß in der Mikroküvette der gesamte Volumeninhalt dem Erregerlicht ausgesetzt ist und so der photooxidative Zerfall des CTC stark zum Tragen kommt, während in der 4 ml Küvette durch den Rührer ständig ein Austausch von lichtexponiertem und nicht lichtexponiertem CTC stattfindet und so den Intensitätsabfall durch CTC-Zerfall teilweise kompensiert.

Schließlich bereitete die Medikamentenzugabe in die Mikroküvette während der Messung Probleme, da bei stehender Zellsuspension das auf den Flüssigkeitsspiegel aufgebrachte Medikament lange Zeit benötigte, bis es alle Zellen erreicht hatte. Bei der 4 ml Küvette war jedoch durch den Magnetrührer eine sehr rasche Verteilung des Medikaments gegeben.

All diese Schwierigkeiten mit der Mikroküvette, die auf fehlendes Rühren zurückzuführen sind, konnten auch durch Versuche mit einer Pumpe, die aus einem 500 µl Suspensionsreservoir die Küvette durchfluten und damit die Sedimentation und den übermäßigen CTC-Zerfall verhindern sollte,

nicht gelöst werden.

Deshalb wurden alle Messungen in der 4 ml Küvette durchgeführt. Für die Optimierung der Methode und für die pharmakologische Testung dienten ganze Embryonen als Zellmaterial. Dadurch konnte ich aus einer relativ geringen Embryonenanzahl mit kleinem Präparationsaufwand Messungen mit der erforderlichen Zelldichte durchführen. Die gleichen Messungen wurden dann mit Zellen nur aus Extremitätenknospen mit einem großen Präparationsaufwand wiederholt, um so zur ursprünglichen Fragestellung zurückzukehren.

3.1.2. Färbevorgang

Der Zeitpunkt der CTC-Zugabe zur Zellsuspension hatte großen Einfluß auf den Verlauf der Meßkurven, da der Eintritt des CTC in die Zelle Zeit in Anspruch nimmt. Zunächst inkubierte ich die noch unverdünnte Zellsuspension in CTC mindestens 10 Minuten, und erst zur Messung in der Quarzküvette wurde volle Hankslösung zur Verdünnung zugefügt. Aufgrund der jetzt plötzlich niedrigen extrazellulären CTC-Konzentration ergab sich in den ersten 3-4 Minuten der Messung eine exponentielle Intensitätsabnahme, die dann in einen linearen Abfall überging, der zum Teil auf CTC-Zerfall im Erregerlicht und auf geringe Verklumpung der Zellen zurückzuführen war. Diese Art der Färbung und Zellsuspensionsverdünnung hatten auch Mikkelsen und Schmidt-Ullrich (1980) bei ihren Thymozyten angewandt.

Da die erwartete Reaktion auf Acetylcholin-Reizung eine zunächst sehr geringe Abnahme der Intensität darstellte, war sie in einer ohnehin schon abfallenden Kurve schlecht zu erkennen.

Daraus ergab sich folgendes Vorgehen bei der Zellfärbung: Die Zellsuspension wurde nach dem Zentrifugieren verdünnt. Erst unmittelbar vor der Messung gab ich 200 µl CTC-Lösung zu. Die Kurve zeigte daraufhin einen ansteigenden Teil, der nach ca. 10 Minuten in eine Plateauphase überging, um dann in einem linearen Teil langsam abzufallen. Diese Abnahme der Intensität ist zum größten Teil auf den lichtbedingten CTC-Zerfall zurückzuführen. Reizungen der Zellen

im noch flach ansteigenden Teil der Kurve ergaben dann auch optisch deutlich erkennbare Reaktionen.

Weil der Kurvenanstieg durch die CTC-Aufnahme der Zellen bei Anfärbung unmittelbar vor der Messung bei jeder Zellsuspension konstant war, verlegte ich die Färbung der Zellen aus dem Fluorometer in einen lichtdichten, auf 37° C geheizten Brutschrank. Das hatte den Vorteil, daß die Zellen dem Erregerlicht, das mit 389 nm im UV-Bereich liegt, nicht unnötig ausgesetzt waren, ebenso trat während dieser Zeit kein lichtbedingter CTC-Zerfall auf.

Um die verschiedenen Meßkurven besser miteinander vergleichen zu können, legte ich die Medikamentenzugabe in den horizontalen bis leicht abfallenden Teil der Fluoreszenzintensitätskurve.

Aufgrund der Vorversuche habe ich folgendes Vorgehen gewählt: Die Zellen wurden in verdünnter Meßkonzentration von ca. 10^7 Zellen/ml für 10 Minuten mit 200 µl 0,2 mM CTC-Lösung in einem 37° C warmen Brutschrank in Dunkelheit inkubiert. Anschließend begann die Messung im Fluorometer mit sofortiger Kurvenaufzeichnung.

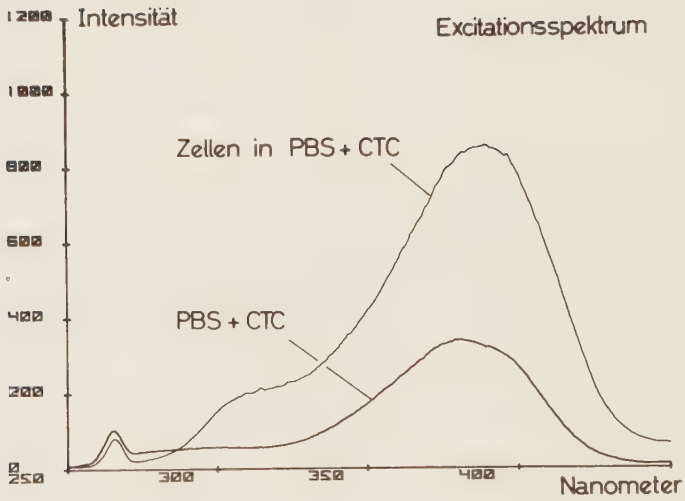


Abbildung 1

Abb. 1: Originalausdrucke des x-y-Schreibers zweier Messungen von Excitationsspektren einer Dulbecco's PBS-Pufferlösung mit CTC 2 x 10^{-5} M, einmal mit und einmal ohne Zellen ganzer Hühnerembryonen (ca. 10^{7} Zellen/ml). Intensitätsmaxima bei 390 nm mit Zellen und bei 381 nm ohne Zellen. Intensitätserhöhung durch die Zellen von 337 Intensitätseinheiten auf 846 Intensitätseinheiten.

3.1.3. Spektren

Zur Ermittlung derjenigen Wellenlänge des Erregerlichtes (Excitation), bei der die Meßprobe ihre stärkste Fluoreszenz zeigt, wurden Excitationsspektren mit CTC in Methanol gemessen. Dabei registrierte die Fluoreszenzlicht-Meßzelle die Wellenlänge von 529 nm als Maximum der Emission. Das Maximum der Anregung lag bei 389 nm.

Um ein Quenching, das heißt eine Intensitätsabsorption durch die Medikamente selbst auszuschließen, zeichnete ich die einzelnen Spektren der Medikamente, die in den Versuchen mit Zellen benutzt wurden, in Hankslösung mit CTC auf und konnte als Ergebnis festhalten, daß alle Medikamente weder zu einer Wellenlängenverschiebung des Fluoreszenzmaximum noch zu einer Veränderung der Fluoreszenzintensität führten.

Zur Differenzierung des Fluoreszenzanteils der extrazellulären CTC-Komplexe von dem der membrangebundenen intrazellulären zeichnete ich das Excitationsspektrum von CTC in Puffer ohne und mit Zellen bei gleicher Fluorometereinstellung auf (Abb.1). Die Fluoreszenzintensität mit den Zellen und den dadurch bedingten membrangebundenen CTC-Kation-Komplexen betrug das 2,5-fache des Intensitätswertes ohne Zellen. Außerdem verschob sich das Excitationsmaximum von 381 nm auf 390 nm, also auf das Maximum des CTC-Ca-Komplexes in apolarer Umgebung. Damit war gesichert, daß der größte Teil der gemessenen Fluoreszenz durch membrangebundene CTC-Ca-Komplexe verursacht wird, und somit auch Intensitätsänderungen auf Veränderungen dieser Komplexe beruhen.

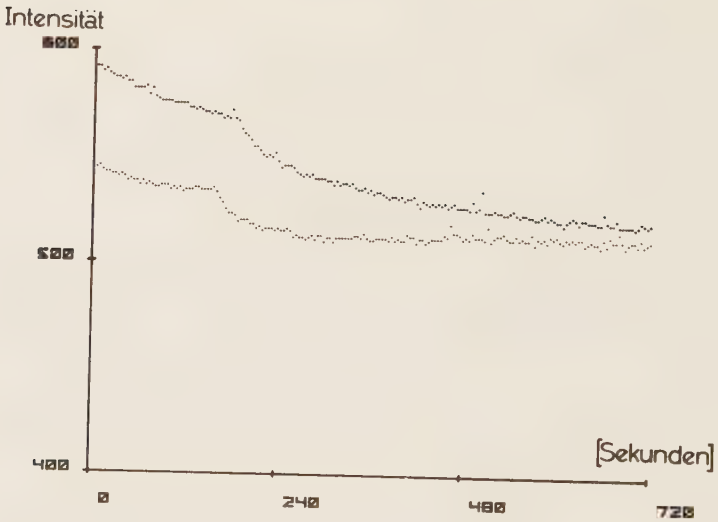


Abbildung 2

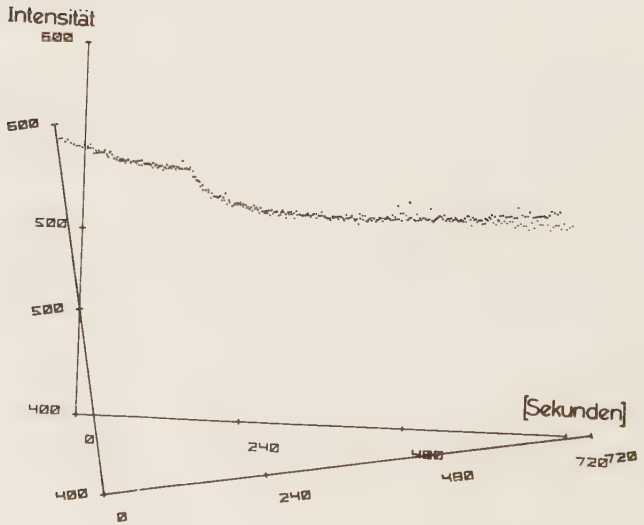


Abbildung 3

Abb. 2: Zwei direkte Ausdrucke vom x-y-Schreiber zweier Messungen mit Zugabe von Acetylcholin wurden in Deckung des Koordinatenkreuzes übereinander projeziert zum Vergleich der Kurven. Inhalt der Meßküvette: Zellsuspension ganzer Embryonen (10^7 Zellen/ml), CTC 2 x 10^{-5} M, Eserin 10^{-4} M; Zugabe von Acetylcholin 10^{-4} M während der Messung.

Abb. 3: Die beiden Kurven von Abb. 2 wurden so verschoben und gedreht, daß sich die Kurvenabschnitte vor Acetylcholinzugabe aufeinander projezieren, um die beiden Fluoreszenzintensitätsabnahmen miteinander zu vergleichen. Da Steigung und Anfangsintensität der Kurven konstante Charakteristika der jeweiligen Messung sind, können diese Parameter zum Vergleich zweier Kurven einander angepaßt werden.

3.1.4. Vergleich der Meßkurven

Die Zugabe von Acetylcholin beantworteten die embryonalen Zellen des Hühnchens mit einer deutlichen Fluoreszenzintensitätsabnahme. Diese Reaktion benutzte ich, um die Reproduzierbarkeit meiner Messungen zu prüfen und führte diesen Versuch mit Acetylcholin an mehreren Zellsuspensionen durch. Die Intensitätshöhe zu Beginn der Messung und die Steigung der Kurven vor Zugabe eines Medikaments waren nicht konstant, wie in Abb. 2 zu sehen ist. Diese beiden Werte stellen jedoch innerhalb der einzelnen Messung Konstanten dar und waren die Charakteristika der jeweiligen Zellsuspension. Deshalb verschob und drehte ich die Blätter, bis die Kurvenanteile am Beginn der Messung übereinstimmend waren (Abb. 3). Abb. 2 zeigt also den gleichen Versuch, das heißt Reizung mit Acetylcholin, jedoch mit Zellsuspensionen aus zwei verschiedenen Präparationsgängen. Die Differenzen der Anfangsintensität liegen im Bereich der Streuung zwischen verschiedenen Zellsuspensionen, während der unterschiedlich große Abfall zum Teil auf unterschiedlich starke Verklumpung der Zellen während der Messung, die immer in geringem Maße stattfand, zurückzuführen ist. Abb. 3 zeigt, wie ich die Kurven zum Vergleich der Reaktionen verschoben und verdreht habe. Auf diese Weise aneinander angepaßt, zeichnete ich die Abb. 7, 8, 10 und 11; dagegen verzichtete ich der Übersichtlichkeit wegen auf eine Quantifizierung der Anfangsintensitätswerte bei den Abb. 9 und 12. Alle übrigen Kurven (Abb. 1, 4, 5, 6, 13, 14) sind Originalausdrucke vom Plotter.

Die Kurven von Abb. 2 bzw. 3 sind identisch mit den beiden oberen in Abb. 6.

Die Geräteeinstellungen waren bei allen Messungen identisch, so daß ein quantitativer Vergleich der Fluoreszenz der verschiedenen Zellsuspensionen aus ganzen Embryonen, Extremitätenknospen und glatten Muskelzellen möglich ist.

Abbildung 4

Abbildung 5

Abb. 4: Mikroskopisches Bild einer Zellsuspension aus ganzen Hühnerembryonen im Stadium 23/24 nach Hamburger & Hamilton nach dem Zentrifugieren in einer Neubauer-Zählkammer. Die Zellkonzentration ist zum Zählen zu groß. Die Suspension wurde zur Ermittlung der Zelldichte entsprechend verdünnt. Vergrößerung: 100fach

Abb. 5: Mikroskopisches Bild einer Zellsuspension aus glatten Muskelzellen der Taenien des Meerschweinchencolons in einer Neubauer-Zählkammer. Dabei handelt es sich bei den langgestreckten Zellen um Myozyten, bei den runden Zellen um abgerundete Myozyten oder möglicherweise auch um Bindegewebszellen. Vergrößerung: 100fach

3.2. Messungen mit Zellsuspensionen ganzer Embryonen

3.2.1. Reizung mit Acetylcholin mit und ohne Blocker

Die Zellen ganzer Hühnerembryonen - Abb. 4 zeigt ein Zählkammerpräparat der Suspension direkt nach dem Zentrifugieren, also mit einer höheren Zelldichte als bei der Messung - in voller Hankslösung mit 2 x 10^{-5} M CTC und 10^{-4} M Eserin bei einer Zelldichte von 10^{7} Zellen/ml wurden durch Zugabe von 20 µl 10^{-2} M Acetylcholin (das heißt 10^{-4} M in der Meßlösung) während der Kurvenaufzeichnung gereizt. Nach ca. 2 Sekunden trat eine exponentielle Abnahme der Fluoreszenzintensität auf, die nach etwa 2 Minuten in die Steigung der Kurve vor der Acetylcholinzugabe, nur auf einem niedrigeren Niveau, überging (Abb. 6, die beiden oberen Kurven). Eine weitere Reizung mit Acetylcholin führte zu keiner erneuten Intensitätsabnahme (Kurve nicht abgebildet).

Der Rückgang der Fluoreszenz durch 10^{-4} M Acetylcholin konnte durch Atropin 10^{-4} M, das vor Beginn der Messung zugegeben wurde, aufgehoben werden (Abb. 6, dritte Kurve von oben). Zugabe von 10^{-4} M d-Tubocurarin oder Dedamethonium, beides nikotinische Blocker, beeinflußte die Reaktion auf die Acetylcholinreizung nicht (Abb. 7). Im Falle des Decamethonium wurde sie sogar etwas verstärkt; diese Abweichung ist jedoch im Rahmen der Streuung verschiedener Zellsuspensionen zu sehen und somit nicht von Relevanz.

3.2.2. Basiskurve ohne Ca und Mg

Um eine Basiskurve mit Zellen, aber ohne Fluoreszenzanteil durch CTC-Kation-Komplexe zu erhalten, behandelte ich einen Präparationsgang die Zellen nur mit Ca,Mg-freier Hankslösung, das heißt auch Trypsininhibitorlösung aus Sojabohne und CTC wurden in Ca,Mg-freier Hankslösung angesetzt. Zur Bindung der aus den Zellen austretenden Kationen wurde EDTA auf 0,88 mM zur Suspension eingewogen. Wie bei allen Messungen gab ich zur Verhinderung des schnellen Acetylcholinabbaus durch die zelluläre Cholinesterase Eserin 10^{-4} M in die Meßlösung. Die Intensität der Fluoreszenz

dieser Ca,Mg-frei behandelten Zellen lag bei der Hälfte der vorherigen Versuche. Eine Reaktion auf Acetylcholin fand nicht statt (Abb. 6, unterste Kurve).

3.2.3. Abstufung der Acetylcholinreaktion

Die Quantität des Fluoreszenzintensitätsabfalls, ausgelöst durch die Zugabe von Acetylcholin, konnte durch Verwendung niedrigerer Konzentrationen von Acetylcholin abgestuft werden: Die bisher verwendete Konzentration von 10^{-4} M ergab den Ausschlag in gewohnter Weise; Verminderung der Konzentration auf 10^{-5} M bzw. 10^{-6} M resultierten in einer geringeren Intensitätsabnahme (Abb. 8).

Die Reaktion bei 10^{-6} M Acetylcholin war aber dennoch größer als bei Messungen, bei denen nur 20 µl volle Hankslösung oder Medikamente, die keine Reaktion verursachten, wie z.B. Atropin oder Acetylcholin bei Atropinanwesenheit, zugegeben wurden (Abb. 5, 6, 10, 14). Solche Zugaben führten, wenn überhaupt, lediglich zu einer minimalen Depression der Kurve, die sich nach ca. 10 Sekunden ausgeglichen hatte. Der Verdünnungseffekt durch Zugabe von 20 µl irgendeiner Lösung hatte also keinen Einfluß auf die Fluoreszenzintensität.

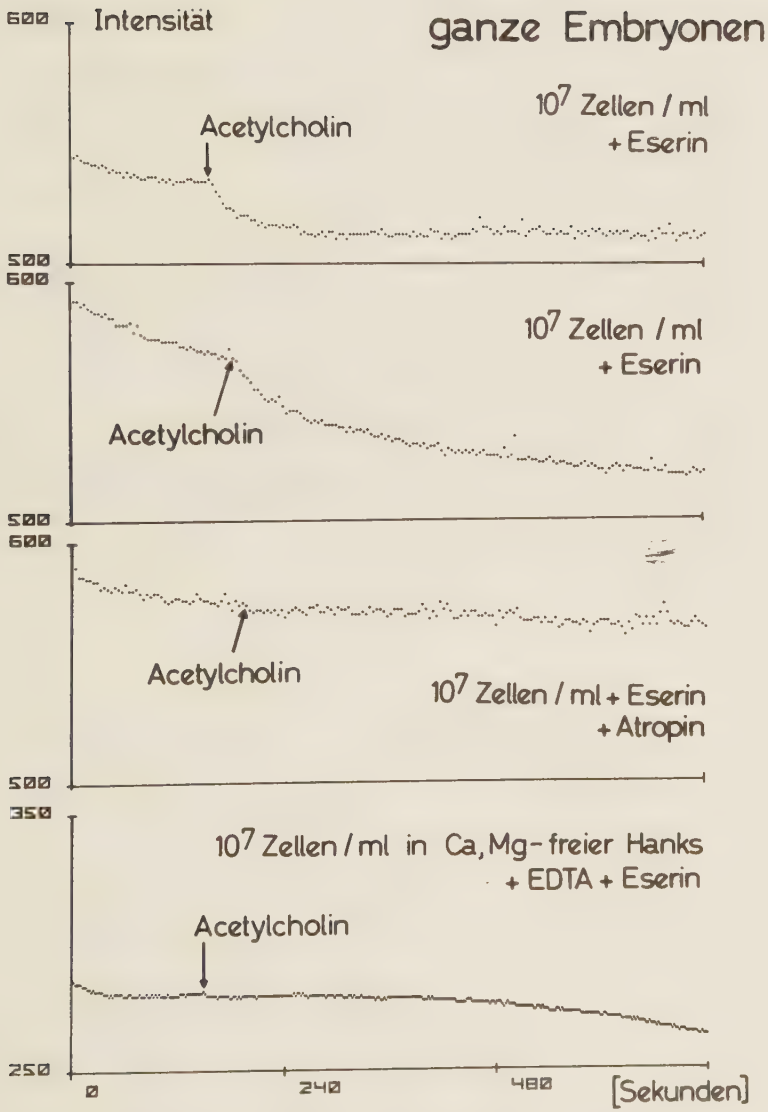

600
Intensität
ganze Embryonen
10^7 Zellen / ml
+ Eserin
Acetylcholin
500
600
10^7 Zellen / ml
+ Eserin
Acetylcholin
500
600
Acetylcholin
10^7 Zellen / ml + Eserin
+ Atropin
500
350
10^7 Zellen / ml in Ca, Mg-freier Hanks
+ EDTA + Eserin
Acetylcholin
250
0
240
480
[Sekunden]

Abbildung 6

Abb. 6: Vier Originalausdrucke von Versuchen mit Zellsuspensionen ganzer Hühnerembryonen bei einer Zelldichte von 10^7 Zellen/ml. Kurven von oben nach unten:

- Zellsuspension mit Chlorotetracyclin (CTC) 2×10^{-5} M, Eserin 10^{-4} M, Zugabe von Acetylcholin 10^{-4} M zum mit Pfeil bezeichneten Zeitpunkt, die eine Abnahme der Fluoreszenzintensität induziert.
- Gleicher Versuch wie oben, jedoch mit einer neuen Zellsuspension.
- Zellsuspension mit CTC 2×10^{-5} M, Eserin 10^{-4} M und Atropin 10^{-4} M; Zugabe von Acetylcholin zum bezeichneten Zeitpunkt verursacht keine Änderung der Intensität.
- Zellsuspension, die während der Präparation und der Messung Ca,Mg-frei behandelt wurde, mit CTC 2×10^{-5} M, Eserin 10^{-4} M, EDTA $0{,}88 \times 10^{-3}$ M; Zugabe von Acetylcholin 10^{-4} M zum bezeichneten Zeitpunkt. Bei sehr geringer Fluoreszenzintensität erfolgte keine Änderung der Intensität auf Acetylcholinzugabe.

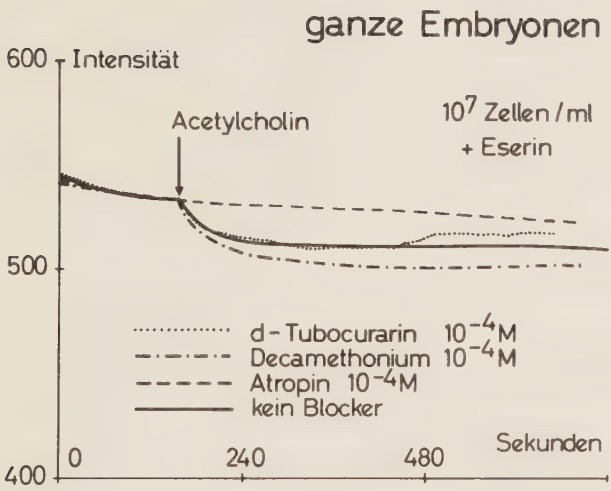


Abbildung 7

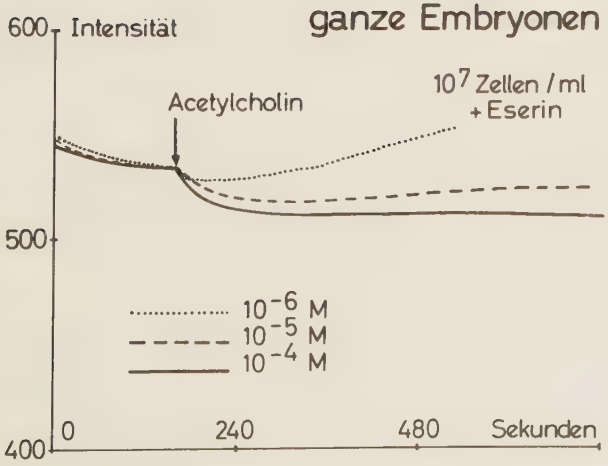


Abbildung 8

Abb. 7: Übereinanderprojektion von vier Meßkurven vier verschiedener Zellsuspensionen ganzer Embryonen. Inhalt aller Messungen: CTC 2 x 10^{-5} M, Eserin 10^{-4} M, Zugabe von Acetylcholin zum bezeichneten Zeitpunkt. Bei drei Versuchen wurden vor Beginn der Messung jeweils ein Blocker cholinerger Rezeptoren zugegeben. Atropin als muskarinischer Blocker konnte die Fluoreszenzabnahme hemmen, die nikotinischen Blocker d-Tubocurarin und Decamethonium waren dazu nicht in der Lage.

Abb. 8: Übereinanderprojektion dreier Meßkurven von Zellsuspensionen ganzer Embryonen mit CTC 2 x 10^{-5} M, Eserin 10^{-4} M und Zugabe von Acetylcholin in verschiedenen Konzentrationen zum bezeichneten Zeitpunkt. Die Abnahme der Fluoreszenz ist im Konzentrationsbereich von 10^{-6} bis 10^{-4} M zur Konzentration des Acetylcholins proportional.

3.2.4. Reizung mit Parasympathomimetika

Eine Reizung der Zellen mit muskarinischen Agonisten des Acetylcholins wie Tremorin, Betanechol und Pilocarpin, alle 10^{-4} M, verursachte einen kleinen abrupten Intensitätsabfall, der sich wieder an das ursprüngliche Niveau innerhalb von ca. 2 Minuten anglich (Abb. 9). Der stufige Abfall war jedoch in jedem Fall größer als bei der Kontrollzugabe von voller Hankslösung.

Ein zweites Versetzen der Zellsuspension mit Tremorin ergab eine erneute Stufenbildung in gleicher Form wie die erste (Kurve nicht abgebildet).

Eine Reizung der Zellen mit Acetylcholin nach Betanechol löste eine Fluoreszenzabnahme in gewohnter Weise aus (Kurve nicht abgebildet, vgl. Abb. 12).

3.2.5. Messungen mit dem Ca-Antagonist Verapamil

Eine nur geringe Änderung in Form eines leicht vergrößerten Ausschlags, die im Rahmen der Streubreite der Zellsuspension zu sehen ist, ergab sich auf den Acetylcholinreiz durch Anwesenheit von 10^{-6} M Verapamil in der Meßlösung (Abb. 10). Dabei hatte ich einmal das Verapamil unmittelbar vor Beginn der Kurvenaufzeichnung bei üblicher Zellpräparation zugegeben (Kurve (a) in Abb. 10). Das andere Mal behandelte ich die Zellen während der Zellpräparation Ca,Mg-frei und fügte das Verapamil zusammen mit voller Hankslösung zur Verdünnung der Zellen nach der Zentrifugation bei. Das Angebot von Ca und Mg durch die Hankslösung erfolgte also gleichzeitig mit der Zugabe von Verapamil. Die Messung dieser Zellsuspension ergab Kurve (b) in Abb. 10.

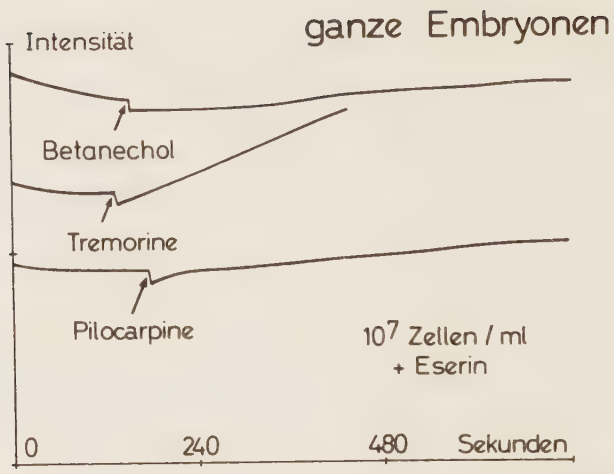


Abbildung 9

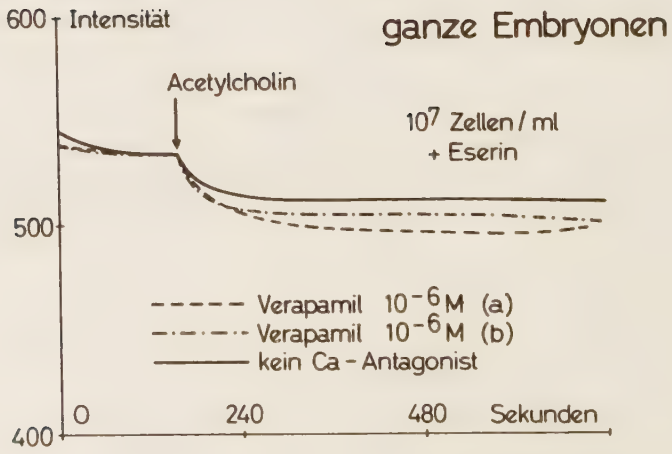


Abbildung 10

Abb. 9: Versetzte Zeichnung dreier Meßkurven von Zellsuspensionen ganzer Embryonen mit CTC 2 x 10^{-5} M, Eserin 10^{-4} M und Zugabe der bezeichneten Parasympathomimetika an den gekennzeichneten Stellen. Bei allen drei Medikamenten zeigte sich ein geringer abrupter Abfall der Intensität.

Abb. 10: Übereinanderprojektion dreier Meßkurven von Zellsuspensionen ganzer Embryonen mit CTC 2 x 10^{-5} M, Eserin 10^{-4} M und Zugabe von Acetylcholin 10^{-4} M zum bezeichneten Zeitpunkt. Bei zwei Kurven befand sich in der Meßlösung der Ca-Antagonist Verapamil 10^{-6} M: Bei Kurve (a) Zugabe von Verapamil kurz vor der Messung, bei Kurve (b) wurde die Präparation der Suspension Ca,Mg-frei durchgeführt und das Verapamil gleichzeitig mit der jetzt Ca,Mg-haltigen Pufferlösung, die zur Zellkonzentrationsverdünnung auf 10^{7} Zellen/ml benutzt wurde, zugegeben. Die Vergrößerung der Fluoreszenzverminderung gegenüber der Kurve ohne Ca-Antagonist ist im Rahmen der Streubreite verschiedener Zellpräparationen zu sehen.

3.3. Messungen mit Zellsuspensionen aus Extremitätenknospen

3.3.1. Reizung mit Acetylcholin mit und ohne Blocker

Die Zellen der Extremitätenknospen reagierten auf Acetylcholinzugabe mit einer Abnahme der Fluoreszenzintensität. Dabei waren der Umfang und der Kurvenverlauf der Intensitätsverminderung bei den Zellen der Extremitätenknospe identisch mit denen bei Zellen ganzer Hühnerembryonen. Die Antwort der Extremitätenknospenzellen auf Acetylcholin ließ sich durch die Anwesenheit von Atropin 10^{-4} M vollständig hemmen (Abb. 11). Auch dies entspricht dem Ergebnis bei Messungen mit Embryonalzellen ganzer Hühnchen.

3.3.2. Reizung mit Parasympathomimetika

Die Versuche mit Pilocarpin und Betanechol an Zellen der Extremitätenknospe korrelierten ebenfalls mit denen an Zellen ganzer Embryonen: Beide Agonisten verursachten einen stufigen Abfall der Intensität, wobei die Stufe bei Pilocarpin größer war als bei Betanechol. Eine anschließende Acetylcholinzugabe erbrachte wieder den gewohnten Ausschlag (Abb. 12).

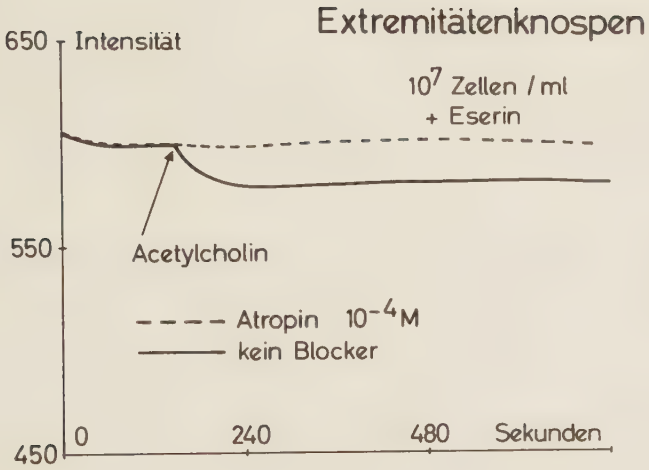


Abbildung 11

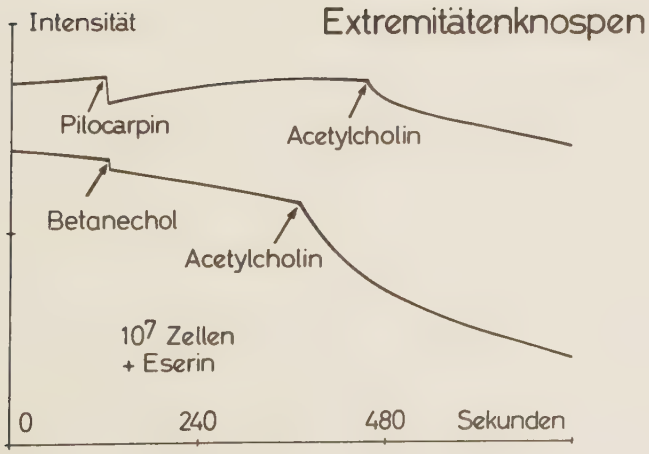


Abbildung 12

Abb. 11: Übereinanderprojektion zweier Meßkurven von Zellsuspensionen aus Extremitätenknospen der Hühnerembryonen mit CTC 2 x 10^{-5} M, Eserin 10^{-4} M und Zugabe von Acetylcholin zum bezeichneten Zeitpunkt. Die Suspension der gestrichelten Meßkurve enthielt noch zusätzlich den muskarinischen Rezeptorenblocker Atropin 10^{-4} M. Damit ließ sich die Reaktion der Zellen, das heißt der Fluoreszenzabfall, verhindern.

Abb. 12: Versetzte Zeichnung zweier Meßkurven von Zellsuspensionen aus Extremitätenknospen der Hühnerembryonen mit CTC 2 x 10^{-5} M, Eserin 10^{-4} M und Zugabe von Pilocarpin 10^{-4} M oder Betanechol 10^{-4} M und Acetylcholin 10^{-4} M zu den bezeichneten Zeitpunkten. Dem stufenartigen Abfall der Intensität aufgrund Reizung mit Agonisten folgte eine Acetylcholinreizung, die mit einer Abnahme der Intensität in der gewohnten Form beantwortet wurde. Die Reaktionen auf oben erwähnte Agonisten darf daraufhin nicht als eine biologische gewertet werden.

3.4. Messungen mit Zellsuspensionen aus glatten Muskelzellen des Meerschweinchendarms

3.4.1. Reizung mit Acetylcholin

Um das Meßsystem und die Methode zu überprüfen, führte ich Versuche mit glatten Muskelzellen durch, an denen ein muskarinischer Rezeptor nachgewiesen ist (Keidel 1979). Dazu präparierte ich die Zellen der Muskeltaenien des Dickdarms zweier Meerschweinchen. Abb. 5 zeigt das Zählkammerpräparat der disaggregierten Zellen vom Darm in der Konzentration, mit der die Messung erfolgte. Dabei sind die langgestreckten Zellen einzelne Myozyten, während es sich bei den runden Zellen um abgerundete Myozyten oder auch um Bindegewebszellen handelt.

Die Zellmenge reichte für zwei Messungen mit gleich hoher Zelldichte von ca. $0{,}7 \times 10^7$ Zellen/ml. Wie bei allen anderen Zellsuspensionen fügte ich auch hier Eserin 10^{-4} M als Cholinesteraseblocker bei.

Die Fluoreszenz zu Beginn der Messung war bei dieser Zellsuspension aus glatten Muskelzellen um das etwa 1,7-fache höher als bei den embryonalen Zellen. Für die Myozyten war demnach die Zellkonzentration von ca. 10^7 Zellen/ml zu hoch. Auf die Acetylcholinreizung antworteten die Zellen mit einer kleineren und sprunghafteren Intensitätsabnahme, die nach ca. 5 Minuten wieder auf das Niveau der Kurve vor der Reizung anstieg (Abb. 13). Die Reaktion hatte also im Gegensatz zu den bisherigen Versuchen mit embryonalen Zellen eine Wannenform. Eine weitere Reizung mit Acetylcholin erbrachte einen nicht verwertbar kleinen Ausschlag (Kurve nicht abgebildet).

3.4.2. Reizung mit Pilocarpin

Die Zugabe von Pilocarpin 10^{-4} M in die Zellsuspension aus glatten Muskelzellen ergab eine ungewöhnlich große Abnahme der Fluoreszenz, die sich nicht wieder auf das vorherige Intensitätsniveau hob. Diese deutliche Reaktion ließ sich durch erneute Reizungen mehrere Male wiederholen (Abb. 14). Zwischen diesen Pilocarpin-Reizungen fügte ich noch nacheinander Acetylcholin, Betanechol und Atropin bei, außerdem noch eine Kontrolle mit voller Hankslösung (Abb. 14),

weil mir nur zwei Zellsuspensionen zur Verfügung standen und ich dennoch möglichst viele Medikamente testen wollte. Dabei traten aber nur kleine nicht relevante Intensitätsveränderungen auf.

Der relative Umfang der Intensitätsabnahme auf Pilocarpinreiz verkleinerte sich kontinuierlich. Dies stellte ich durch quantitative Auswertung der Kurven von Abb. 14 fest:
1. Abnahme: von 895 Intensitätseinheiten vor der Pilocarpinzugabe auf 767 Intensitätseinheiten nach Ende der medikamentbedingten Abnahme der Fluoreszenz. In kurzer Schreibweise:

1. Abnahme: von 895 auf 767: - 14,3 %
2. Abnahme: von 696 auf 600: - 13,8 %
3. Abnahme: von 554 auf 500: - 9,7 %
4. Abnahme: von 469 auf 436: - 7,0 %
5. Abnahme: von 413 auf 390: - 5,6 %

Dabei entspricht jeweils der Intensitätswert bei Pilocarpinzugabe dem 100 %-Wert.

Die glatten Muskelzellen antworteten also auf Pilocarpin mit einer wiederholbaren Reaktion, die jedoch nach jeder Reizung kleiner wurde.

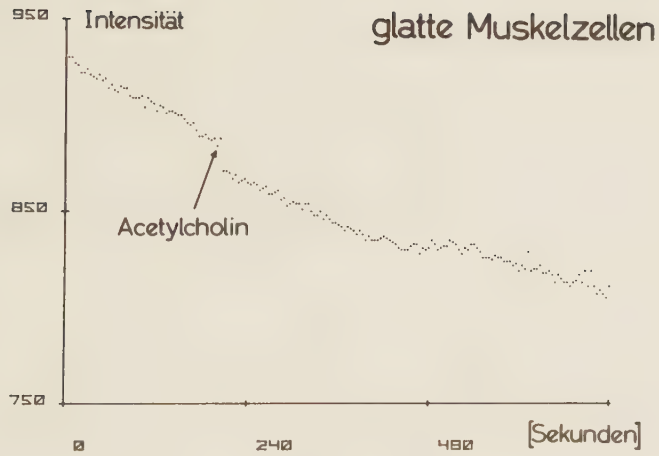


Abbildung 13

Abb. 13: Originalausdruck einer Zellsuspension aus glatten Muskelzellen des Meerschweinchencolons mit 0,7 x 10^{7} Zellen/ml, CTC 2 x 10^{-5} M, Eserin 10^{-4} M und Acetylcholinzugabe 10^{-4} M zum bezeichneten Zeitpunkt. Die aufgetretene Fluoreszenzabnahme erholte sich wieder während der folgenden 5 Minuten nach der Reizung.

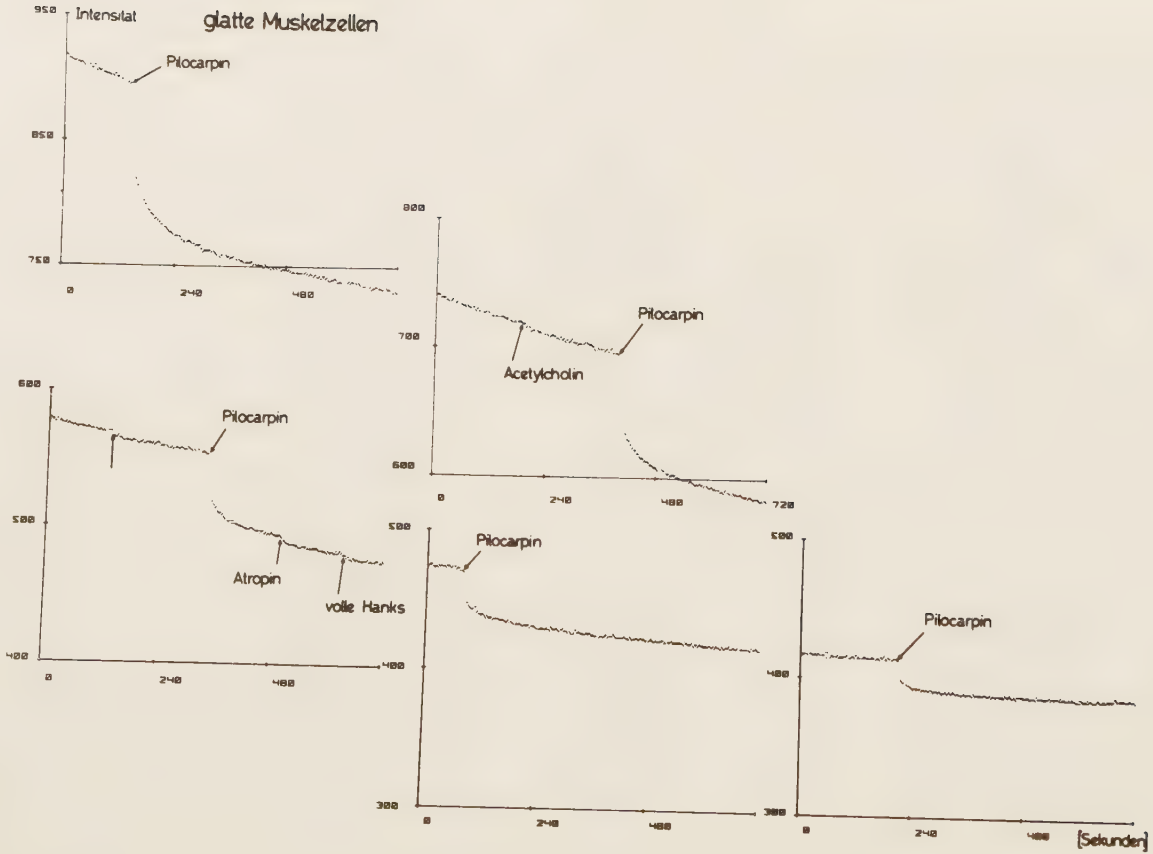


Abbildung 14

Abb. 14: Aneinanderreihung von fünf Originalausdrucken der gleichen Zellsuspension aus glatten Muskelzellen des Meerschweinchencolons mit 0,7 x 10^7 Zellen/ml, CTC 2 x 10^{-5} M, Eserin 10^{-4} M und Zugabe von Pilocarpin 10^{-4} M, Acetylcholin 10^{-4} M, Betanechol 10^{-4} M (nicht bezeichneter Pfeil), Atropin 10^{-4} M, volle Hankslösung jeweils zum bezeichneten Zeitpunkt. Die wiederholte Pilocarpinreizung wurde immer mit einem Intensitätsabfall beantwortet, der jedoch in seinem Ausmaß, relativ zur Intensitätsstärke bei Zugabe gesehen, geringer wurde. Die Zugabe der übrigen Medikamente verursachte jeweils nicht verwertbar kleine Fluoreszenzänderungen, die der durch die Kontrollzugabe von Pufferlösung verursachten nicht verschieden waren.

4. Diskussion

In embryonalen Geweben findet sich eine Cholinesterase-Aktivität, die nicht auf das Nervensystem zu beziehen ist. Dabei zeigt sich, daß in jeweils entsprechend frühen Entwicklungsschritten jede Organanlage eine Phase der Cholinesterase-Aktivität aufweist. Diese Cholinesterase-Aktivität der embryonalen Gewebe, die später im Gegensatz zu neuronalem und innerviertem Gewebe diese Aktivität wieder verlieren, wurde zuerst von Drews (1965) im Rattenembryo nachgewiesen. Eine systematische Untersuchung dieser embryonalen Cholinesterase, angefangen beim frühen Blastoderm, erfolgte beim Hühnerembryo (Drews et al. 1966). Speziell der Vorgang der Gastrulation als früher Schritt embryonaler Entwicklung konnte beim Seeigel untersucht werden (Gustafson & Wolpert 1967, Gustafson 1969).

Die Beobachtungen in der Embryogenese verschiedener Spezies in verschiedenen Entwicklungsstufen lassen sich folgendermaßen zusammenfassen: Sobald eine einzelne Organanlage mit der Differenzierung beginnt, kann eine Cholinesterase-Aktivität nachgewiesen werden. Nach Ausbildung der Organstruktur verschwindet die Cholinesterase-Aktivität wieder. Nach Drews (1975) ist die embryonale Cholinesterase-Aktivität mit morphogenetischen Bewegungen korreliert.

Die Aufgabe der Cholinesterase bei der Neurotransmission mit Acetylcholin ist gut bekannt: Nach der Freisetzung des Acetylcholins aus den präsynaptischen Vesikeln und Anlagerung an den Rezeptorstellen der postsynaptischen Membran löst Acetylcholin eine Depolarisation der Membran aus. Die freigesetzte Acetylcholin-Menge wird innerhalb etwa 2 ms durch die Cholinesterase in Cholin und Essigsäure gespalten und verliert so ihre erregende Wirkung auf die postsynaptische Membran (Keidel 1979).

Zwei Typen von Acetylcholin-Rezeptoren können unterschieden werden: An den sogenannten nikotinartigen Rezeptoren wirkt Nikotin wie Acetylcholin erregend. Dieser Rezeptor läßt sich durch Atropin nicht hemmen. Der sogenannte muskarinartige Rezeptor ist mit Atropin hemmbar und läßt sich

durch Muskarin erregen. (Keidel 1979).

Die Untersuchung gerade einer möglichen Ca-Bewegung auf Acetylcholin-Reiz bei Cholinesterase-aktiven Embryonalzellen in dieser Arbeit hat ihre Ursache darin, daß Ca bei vielen biologischen Vorgängen als "second messenger" fungiert. So bewirkt Ca durch Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum in die Muskelzelle die Kontraktion der kontraktilen Elemente (Keidel 1979). Weiter ist bekannt, daß die Freisetzung von Neurotransmittern an sympathischen und parasympathischen Synapsen, sowie Synapsen im Gehirn unter Zwischenschaltung von Ca^{++}-Ionen zustande kommt. So ist auch bei der Freisetzung der Hypophysenvorder- und Hypophysenhinterlappen-Hormone Ca notwendig, wie auch die Insulininkretion der ß-Zellen Ca-abhängig ist (Keidel 1979). Keidel vermutet deshalb, daß Ca^{++}-Ionen als generelles zellphysiologisches Prinzip immer dann als Mittlersubstanz Verwendung findet, wenn in Abhängigkeit von Erregungsvorgängen an der äußeren Zellmembran intrazelluläre Prozesse in Gang gesetzt werden sollen.

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal eine Ca-Verschiebung an Zellen der Extremitätenknospe auf Gabe von Acetylcholin nachgewiesen werden. Die Reizung erfolgte am muskarinischen Rezeptor, den Schmidt (1980) an Zellen der Extremitätenknospe des Hühnerembryos identifiziert hatte. In der Extremitätenknospe befindet sich zum Zeitpunkt der Untersuchung weder motorische Endplatten noch Neurosynapsen. Zur Darstellung einer Reaktion auf diesen Reiz benutzte ich den Fluoreszenzfarbstoff CTC, der mit membrangebundenem Ca eine Komplexbindung eingeht. Diese Methode der Ca-Färbung an intakten Zellen mit CTC hatten auch Babcock et al. (1979) an Hepatozyten und Mikkelsen & Schmidt-Ullrich (1980) mit Thymozyten angewandt.

Deshalb habe ich zunächst die Arbeit von Mikkelsen & Schmidt-Ullrich mit embryonalen Hühnerzellen reproduziert, um über den Vergleich mit den Ergebnissen dieser Arbeit die Methodik und den Apparaturaufbau zu überprüfen. Als entscheidende Änderung gegenüber den wenig erfolgreichen Vorversuchen erwies sich die deutliche Erhöhung der Zell-

dichte auf 10^7 Zellen/ml, auf eine Zelldichte also, wie sie auch Mikkelsen & Schmidt-Ullrich in ihrer Arbeit mit Thymozyten verwandt hatten.

Nach weiteren Verbesserungen der Methode, vor allem der Art der Zellanfärbung mit CTC, konnte ich durch Zugabe von Acetylcholin eine Intensitätsabnahme der Fluoreszenz einer mit CTC gefärbten Zellsuspension aus embryonalen Hühnerzellen bewirken. Die Zellen antworteten also auf die Reizung ihres muskarinischen Rezeptors mit einer Ca-Verschiebung, und zwar mit einer Freisetzung membrangebundenen Ca's. Der größte Teil des membrangebundenen Ca befindet sich in den Mitochondrien. Dies ist auch an den von mir benutzten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar (nicht veröffentlichte Beobachtung).

Auf eine zweite Reizung erfolgte kein erneuter Intensitätsabfall: die Zellen waren nur einmal in der Lage, auf Acetylcholin zu reagieren.

Dieser gut reproduzierbare Abfall der Intensität durch Acetylcholin ließ sich durch Blockade der muskarinischen Rezeptoren der Zellen mit Atropin vollständig unterdrücken (Abb. 7 und 11).

Bei der Reizung mit den Acetylcholin-Agonisten Pilocarpin, Betanechol und Tremorin zeigten die Zellen keine Reaktion. Eine genauere Untersuchung mit diesen Stoffen steht noch aus. Gegenwärtige Versuche mit Carbachol zeigen eine Reaktion in Form einer Fluoreszenzintensitätsabnahme, die größer ist als nach Acetylcholin (Dissertation in Bearbeitung von G. Hartung).

Die Anwesenheit von Blockern nikotinischer Rezeptoren wie d-Tubocurarin oder Decamethonium beeinflußte die Änderung der Fluoreszenzintensität nicht (Abb. 7). Dies bestätigt das Ergebnis der Arbeit von Schmidt (1980), daß der Rezeptor, den embryonale Zellen mit Cholinesterase-Aktivität aufweisen, muskarinischer Natur ist.

Einen Vergleich mit dem muskarinischen Rezeptor glatter Muskelzellen erhielt ich durch Versuche mit Zellsuspensionen aus Zellen der Taenien des Meerschweinchencolons.

Glatte Muskelzellen des Darmes weisen einen muskarini-

schen Rezeptor auf, dessen Reizung mit Acetylcholin aus parasympathischen Fasern zu einer Ausschüttung des Ca aus dem sarkoplasmatischen Retikulum bzw. zu einer Freisetzung des größtenteils oberflächen- und membrangebundenen Ca führt (Keidel 1979). Durch diese intrazelluläre Ca-Konzentrationserhöhung wird die mechanische Reaktion der kontraktilen Elemente in der glatten Muskelzelle induziert. Das heißt die Aktin- und Myosinfilamente gleiten unter dieser erhöhten Ca-Konzentration aneinander vorbei (Keidel 1979).

Bei der ersten meiner beiden Messungen mit glatten Muskelzellen zeigte sich die oben beschriebene Ca-Verschiebung auf die Zugabe von Acetylcholin in Form einer Fluoreszenzabnahme (Abb. 13). Das membrangebundene Ca, das mit CTC einen Komplex gebildet hatte, war in das Zytosol freigesetzt worden; der CTC-Ca-Komplex war von der lipophilen, apolaren Phase in eine wässrige, polare Phase getreten, in der die Fluoreszenz des Komplexes geringer ist als in der apolaren Phase (Caswell & Hutchison 1971a). Eine zweite Reizung mit Acetylcholin bewirkt eine nicht verwertbar kleine Intensitätsabnahme.

Bei der zweiten Messung an glatten Muskelzellen erhielt ich auf die Zugabe des Parasympathomimetikums Pilocarpin eine sehr große Änderung der Fluoreszenz (Abb. 14). Diese Reaktion ließ sich mehrere Male wiederholen, wobei die jeweilige relative Abnahme der Intensität immer geringer wurde. Da ich wegen der schwierigen und aufwendigen Präparation nur Zellmaterial für zwei Messungen hatte, versuchte ich, eine weitere pharmakologische Testung zwischen den Pilocarpin-Reizungen durch Zugabe von Acetylcholin, Betanechol und Atropin zu erreichen. Die resultierenden Intensitätsänderungen waren jedoch von der einer Pufferkontrollzugabe nicht verschieden (Abb. 14). Ein Einfluß der Medikamente auf den Umfang der Reaktion auf die jeweils folgende Pilocarpin-Reizung ließ sich nicht eindeutig erkennen. Die konsequente pharmakologische Testung der glatten Muskelzellen steht noch aus. Dennoch läßt sich sagen, daß sie Resultate der Messungen mit glatten Muskel-

zellen der theoretischen Erwartung entsprach und damit darauf hinweisen, daß es sich bei den Fluoreszenzänderungen um Reaktionen der Zellen auf die Reizung ihres Rezeptors handelt.

Einen weiteren Hinweis, daß es sich um biologische Reaktionen intakter Zellen handelt, erhielt ich durch eine Messung mit vollkommen Ca,Mg-frei behandelten Embryonalzellen. Diese Zellsuspension wies eine um über die Hälfte geringere Fluoreszenzintensität auf, da sich der membrangebundene Ca-Gehalt entsprechend dem fehlenden extrazellulären Ca und dem dadurch entstandenen Konzentrationsgefälle verringert hatte. Eine Zugabe von Acetylcholin bewirkte deshalb auch keine Änderung der Fluoreszenzintensität.

Mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes CTC, der hauptsächlich membrangebundenes Ca färbt, war mir über die Reizung mit Acetylcholin in Form einer Ca-Verschiebung der Nachweis einer biologischen Reaktion der embryonalen Zellen, die eine Cholinesterase-Aktivität und einen muskarinischen Rezeptor aufweisen, gelungen.

5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war der Nachweis einer intrazellulären Kalzium-Verschiebung nach Reizung von Cholinesterase-aktiven embryonalen Zellen an ihrem muskarinischen Rezeptor.

Zur Darstellung des Kalziums verwendete ich den Fluoreszenzfarbstoff Chlorotetracyclin (CTC), der mit Kalzium einen Komplex bildet. Der Kalzium-CTC-Komplex weist membrangebunden eine höhere Fluoreszenz auf als in wässriger Phase. Eine Freisetzung membrangebundenen Kalziums zeigt sich daher in einer Abnahme der Fluoreszenz. Die Fluoreszenzänderungen der Zellsuspensionen wurden in einem Fluorometer gemessen.

Es ergaben sich folgende Resultate:

- Zellsuspensionen embryonaler Zellen des Hühnchens, die mit CTC inkubiert wurden, reagieren nach Zugabe von Acetylcholin mit einer Abnahme der Fluoreszenz.
- Diese Fluoreszenzabnahme auf Acetylcholin läßt sich durch Atropin hemmen. Decamethonium und d-Tubocurarin beeinflussen die Reaktion der Zellen nicht.
- Zellsuspensionen aus Zellen der Extremitätenknospe des Hühnchens, die noch keine differenzierten Nerven- oder Muskelzellen enthalten, zeigen im Stadium der Cholinesterase-Aktivität die gleichen Reaktionen.

Die Meßergebnisse zeigen, daß die embryonalen Zellen auf die Reizung mit Acetylcholin mit einer Ausschüttung von membrangebundenem Kalzium reagieren. Da die Reaktion von Atropin unterdrückt wird, handelt es sich um die Reaktion an einem muskarinischen Rezeptor.

Die Zellen der Extremitätenknospe des Hühnerembryos reagieren im Stadium der Cholinesterase-Aktivität in glei-

cher Weise, so daß ich die Kalzium-Ausschüttung dem an diesen Zellen nachgewiesenen muskarinischen Rezeptor zuordnen kann.

6. Literaturverzeichnis

ALLISON, A.C., YOUNG, M.R.: Uptake of dyes and drugs by living cells in culture. Life Sciences 3, 1407-1414 (1964)

BABCOCK, D.F., CHEN, J.-L.J., YIP, B.P., LARDY, H.Y.: Evidence for mitochondrial localization of the hormone-responsive pool of Ca^{2+} in isolated hepatocytes. J. Biol. Chem. 254, 8117-8120 (1979)

BLACKMORE, P.F., BRUMLEY, F.T., MARKS, J.L., EXTON, J.H.: Studies on alpha-adrenergic activation of hepatic glucose output. J. Biol. Chem. 253, 4851-4858 (1978)

CASWELL, A.H.: The migration of divalent cations in mitochondria visualized by a fluorescent chelate probe. J. Membr. Biol. 7, 345-364 (1972)

CASWELL, A.H.: Methods of measuring intracallular calcium. International Review of Cytology 56, 145-181 (1979)

CASWELL, A.H., HUTCHISON, J.D.: Visualization of membran bound cations by a fluorescent technique. Biochem. Biophys. Res. Commun. 42, 43-49 (1971a)

CASWELL, A.H., HUTCHISON, J.D.: Selectivity of cation chelation to tetracyclines: evidence for special conformation of calcium chelate. Biochem. Biophys. Res. Commun. 43, 625-630 (1971b)

CHANDLER, D.E., WILLIAMS, J.A.: Intracellular divalent cation release in pancreatic acinar cells during stimulus-secretion coupling: 2. Subcellular localization of the fluorescent. J. Cell. Biol. 76, 386-399 (1978)

CHEN, J.-L.J., BABCOCK, D.F., LARDY, H.A.: Norepinephrine, vasopressin, glucagon, and A 23187 induce efflux of calcium from an exchangeable pool in isolated rat hepatocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 2234-2238 (1978)

DREWS, U.: Über das Verhalten der Esterasen, insbesondere der Cholinesterase-Aktivität in der Nebennierenregion der Ratte während der Fetalzeit. Histochemie 4, 514-530 (1965)

DREWS, U.: Cholinesterase in embryonic development. Progress in Histochemistry and Cytochemistry 7/3, Gustav Fischer, Stuttgart (1975)

DREWS, U., DREWS, U.: Cholinesterase in der Extremitätenentwicklung des Hühnchens. I. Die Phasen der Cholinesterase-Aktivität in der jungen Knospe und bei der Abgrenzung von Knorpel- und Muskelanlagen. Wilhelm Roux'Archiv 169, 70-86 (1972)

DREWS, U., KUSSÄTHER, E., USADEL, K.H.: Cholinesterase bei Gestaltungsvorgängen in der Hühnerkeimscheibe. Naturwissenschaften 53, 566 (1966)

DREWS, U., KUSSÄTHER, E., USADEL, K.H.: Histochemischer Nachweis der Cholinesterase in der Frühentwicklung der Hühnerkeimscheibe. Histochemie 8, 65-89 (1967)

DU BUY, H.G., SHOWACRE, J.L.: Selective localization of tetracyclin in mitochondria of living cells. Science 133, 196-197 (1961)

FLUCK, R.A.: Acetylcholin and acetylcholinesterase activity in early embryo of the medako, oryzias latipes, a teleost. Dev. Growth Differ. 20, 17-25 (1978)

GUSTAFSON, T.: Cell recognition and cell contacts during sea urchin development. In: Cellular Recognition. T. Smith and R.A. Goods, eds. New York: Appleton-Century-Crafts, 47-60 (1969)

GUSTAFSON, T., WOLPERT, L.: Cellular movement and contact in sea urchin morphogenesis. Biol. Rev. 42, 442-498 (1967)

HALLETT, M., SCHNEIDER, A.S., CARBONE, E.: Tetracyclin fluorescence as calcium-probe for nerve membrane with some model studies using erythrocyte ghosts. J. Membr. Biol. 10, 31-44 (1972)

HAMBURGER, V., HAMILTON, H.L.: A series of normal stages in the development of the chick embryo. J. Morph. 88, 49-52 (1951)

KEIDEL, W.D.: Kurzgefaßtes Lehrbuch der Physiologie. 5. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1979)

LUTHRA, R., OLSON, M.S.: Studies of mitochondrial calcium movements using chlorotetracyclin. Biochem. Biophys. Acta, 440, 744-758 (1976)

MIKKELSEN, R.B., SCHMIDT-ULLRICH, R.: Concanavalin A induces the release of intracellular Ca^{2+} in intact rabbit thymocytes. J. Biol. Chem. 255, 5177-5183 (1980)

OZAKI, H.: Molecular properties and differentiation of acetylcholinesterase in sea urchin embryos. Dev. Growth Differ. 18, 245-257 (1976)

PAUL, J.: Cell & tissue culture. 5. Edition, Churchill Livingstone, Edinburgh London and New York (1975)

SCHMIDT, H.: Muscarinic acetylcholin receptor in chick limb bud during morphogenesis. Histochemistry 71, 89-98 (1981)

SCHRÖDER, C.: Characterization of embryonic cholinesterase in chick limb bud by colorimetry and disk electrophoresis. Histochemistry 69, 243-253 (1980)

Lebenslauf

Ich, Martin Thomas Kaufenstein, wurde am 11. Mai 1959 als Sohn des Ingenieur grad. Andreas Kaufenstein und der Oberlehrerin Irma Kaufenstein, geb. Fuchs, in Nürnberg geboren.

Nach 4 Jahren Grundschule besuchte ich 9 Jahre das Schloßgymnasium in Kirchheim/Teck, in dem ich im Mai 1978 die Reifeprüfung ablegte. Seit dem WS 1978/79 studiere ich an der Universität Tübingen Humanmedizin. Im August 1980 legte ich die Ärztliche Vorprüfung und im August 1981 den ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ab. Nach bestandenem zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung schloß ich mit dem dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung vom 29. April 1985 mein Studium ab.